

Aus dem Medizinischen Institut für Lufthygiene
und Silikoseforschung an der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof.Dr.med.H.-W. Schlipköter)

UNTERSUCHUNGEN ZUR KOMBINATIONSWIRKUNG VON ZINK UND BLEI

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Jürgen Mende

1976

1978

Aus dem Medizinischen Institut für Lufthygiene
und Silikoseforschung an der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof.Dr.med.H.-W. Schlipköter)

UNTERSUCHUNGEN ZUR KOMBINATIONSWIRKUNG VON ZINK UND BLEI



Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Jürgen Mende

1976

des den Medicinischen Institute zur Verfügung
und Billigung der an der Universität Leiden
(Universitäts-Bibliothek, in Amsterdam, Niederlande)



UNIVERSITEIT LEIDEN
Van Leiden, den 10de Maart 1871
Het Universiteits-Bureau

1871
10de Maart

MEINEN ELTERN GEWIDMET

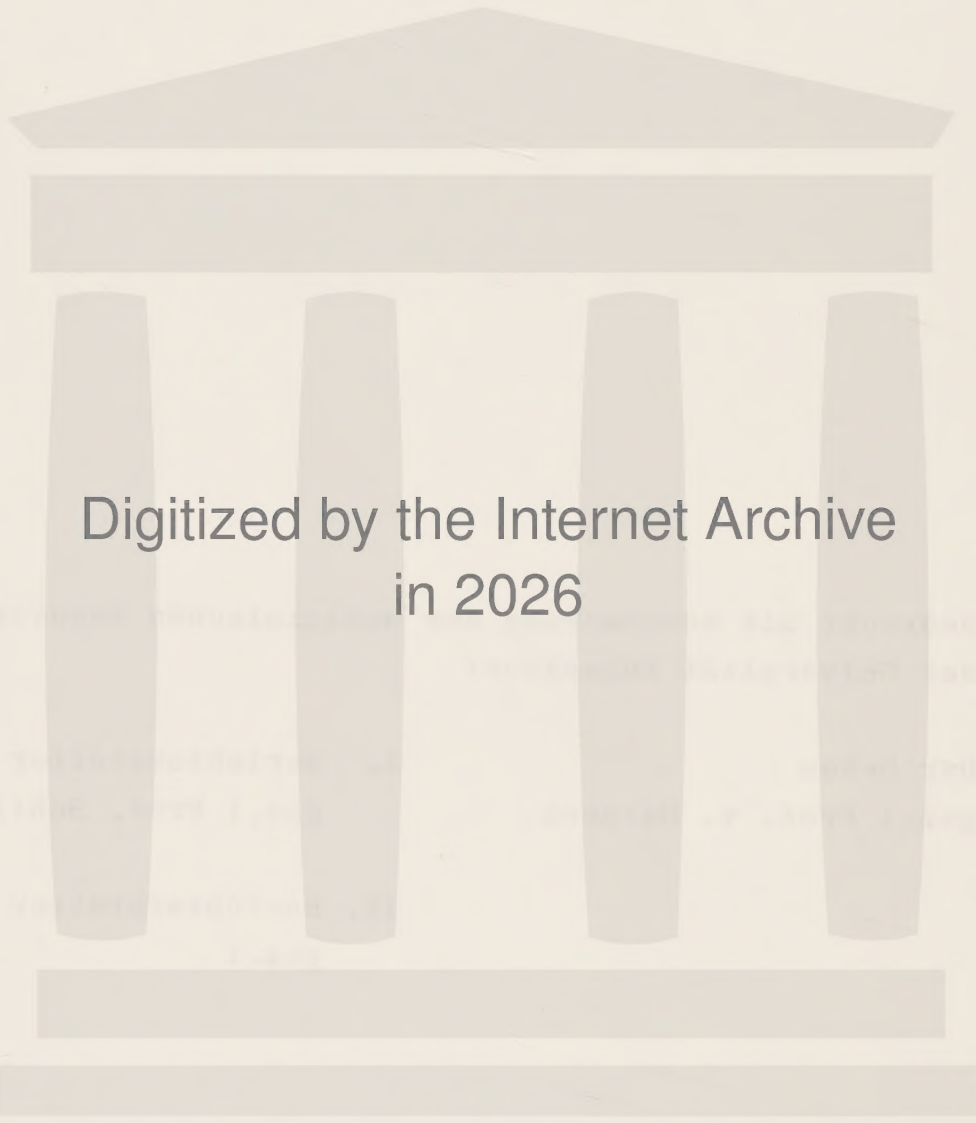


Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
gez.: Prof. v. Harnack

I. Berichterstatter
gez.: Prof. Schlipköter

II. Berichterstatter
gez.:



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548220_0009

INHALTSVERZEICHNIS

SEITE

A.	EINLEITUNG	2
B.	UNTERSUCHUNGEN ZUR KOMBINATIONSWIRKUNG VON ZINK UND BLEI	2
C.	MATERIAL UND METHODEN	4
D.	ERGEBNISSE	5
E.	DISKUSSION	9
F.	ZUSAMMENFASSUNG	11
G.	LITERATUR	12

A. EINLEITUNG

Die gesundheitliche Gefährdung des Menschen durch Luftverunreinigungen ist in den letzten Jahren in eindringlicher Weise allen Bevölkerungsgruppen vor Augen geführt worden.

Ein nicht geringer Prozentsatz dieser Luftverunreinigungen stellt das Blei dar. Das partikelförmige Blei hat, wie wir wissen, zwei Quellen: spezielle Industrieemissionen und Automobilabgase. Beide tragen in wechselndem Maße zur Luftbleikonzentration bei. Der Mensch ist jedoch nicht nur durch seine Atemluft sondern auch durch seine Ernährung exponiert. Außer Zweifel steht, daß das Benzin die Hauptquelle der Bleiemanission ist, doch bleibt umstritten, ob die Bleibelastung der Umwelt bereits eine Gefahr für die menschliche Gesundheit darstellt.

B. UNTERSUCHUNGEN ZUR KOMBINATIONSWIRKUNG VON ZINK UND BLEI

Blei ist, wie andere Schwermetalle, ein Enzymgift und führt zur Hemmung der ALA-D- und Ferrochelataase-Aktivität. Bei diesen an der Haemsynthese beteiligten Enzymen wurde die Bleiwirkung sicher nachgewiesen (5).

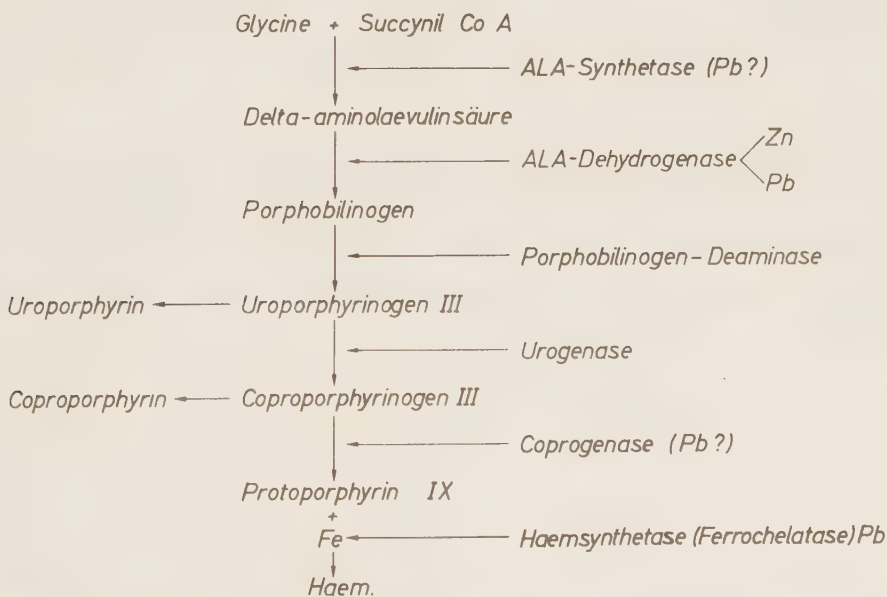


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Haemsynthese mit den Angriffspunkten von Zink und Blei

In früheren Untersuchungen konnten wir zeigen, daß die bleibedingte Hemmung der ALA-D-Aktivität durch Zink konzentrationsabhängig gehemmt wird (1). Der Einfluß von Zink auf die Ferrochelata-seaktivität sowie auf eine durch Blei hervorgerufene Störung dieses Enzyms ist noch nicht untersucht worden. Die Hemmung der Haem-bildung durch Blei ist eine Folge der Störung der Ferrochelata-seaktivität und wird von den meisten Autoren als Schlüssel für die Störung der Haemopoese in der Bleiver-giftung angesehen (1).

Als Parameter zum Nachweis der Schwermetallwirkung auf die Ferrochelata-seaktivität ist die Messung des freien Porphyrins in den Erythrozyten (FEP) geeignet (17). Die Erhöhung des FEP reflektiert die Bleiwirkung in den Erythroidzellen und weist auf eine Einwirkung hin, die 1-3 Monate zurückliegen kann (17). Die Messung des FEP ist deshalb für den Nachweis einer chronischen Bleibelastung besser geeignet als die Be-stimmung des Blut-Blei-Spiegels. Der Blut-Blei-Spiegel korreliert nicht mit der totalen Bleibelastung, weil nach kontinuierlicher Bleiexposition das Schwermetall im Organismus vor allem im Knochen gespeichert wird (6).

Wir untersuchten deshalb die Wirkung dieser Schwermetalle auf die Quantität des freien Protoporphyrins in den Ery-throzyten (FEP) von Mäusen nach einer längeren Exposition mit Zink, Blei und eines Zink-Blei-Gemisches.

C. MATERIAL UND METHODEN

Für unseren Versuch wurden 80 Mäuse vom Stamm NMRI (Gewicht ca. 28-30 g) in 4 Gruppen eingeteilt. Die Mäuse erhielten 8 Wochen lang 0,3 ml der Schwermetall-Lösungen bzw. der physiologischen Kochsalzlösung 5 mal wöchentlich. Die Gesamtdosis von 200 mg ZnCl_2 /10 g Maus und 128 mg PbCl_2 /10 g Maus resultiert aus folgenden Einzeldosen:

1. Kontrollgruppe: NaCl-Lösung
2. ZnCl_2 -Gruppe: 50 μg ZnCl_2 /10 g Körpergewicht
3. PbCl_2 -Gruppe: 32 μg PbCl_2 /10 g Körpergewicht
4. ZnCl_2 + PbCl_2 -Gruppe: 50 μg ZnCl_2 + 32 μg PbCl_2 /
10 g Körpergewicht

Für die FEP-Bestimmungen wurde am 17., 26., 44. und 54. Tag nach Versuchsbeginn Blut retroorbital entnommen und in heparinisierten Röhrchen aufgefangen. Zur Auswertung wurde pro Gruppe (20 Mäuse) das Blut von je 5 Mäusen gepoolt. Von jedem Pool führten wir 4 FEP-Parallelbestimmungen durch nach PIOMELLI (13, 14), modifiziert nach SCHIELE und Mitarbeitern (18).

Reagentien:

1,5 N-Salzsäure

5%ige Celit-Suspension in physiologischer Kochsalzlösung
Essigsäure-Äthylester-Eisessig-Gemisch (4:1).

Geräte:

Fluoreszenz-Spektrometer (Modell SF 100 von Baird-Atomic)

Magnetrührer

Vortexmischer

20 μl Mikropipillaren geeicht (Firma Brand).

Arbeitsvorschrift:

In einem Zentrifugenglas werden 1,5 ml einer 5%igen Celit-Suspension und 20 μ l Blut aus einer geeichten Kapillare kurz gemischt. Man gibt 3 ml des Essigsäure-Äthylester-Eisessig-Gemisches dazu und schüttelt mit dem Vortex-Mischer 10 sec. durch. Nach 30 sec. Zentrifugieren bei etwa 4500 Upm überführt man die Essigsäure-Äthylester-Phase in ein neues Zentrifugenglas. Dazu gibt man 3 ml einer 1,5 N-Salzsäure. Man verschließt das Zentrifugenglas und schüttelt erneut 10 sec. mit dem Vortex-Mischer. Nach 10-minütigem Zentrifugieren bei etwa 4500 Upm wird die untere Phase, die die Porphyrine enthält in ein neues Zentrifugenglas pipettiert.

Die fluorometrische Auswertung erfolgt bei einer Anregungswellenlänge von 405 nm, die Sekundärstrahlung wird zwischen 540 nm und 610 nm registriert. Die Höhe des Intensitätsmaximums wird bei 605 nm abgelesen. Ein Leerwert, der an Stelle des Blutes physiologische Kochsalzlösung enthält, wird in Abzug gebracht. Zum Erstellen einer Eichkurve und zur Eichung des Fluorometers benutzten wir einen Coproporphyrin-I-Standard der Firma Sigma Chemical Company St. Louis/Missouri 63 178. Das Meßergebnis wird unter Berücksichtigung des Hämatokritwertes auf 100 ml rote Blutkörperchen bezogen. Die Umrechnung von Copro- auf Protoporphyrin erfolgt durch eine Formel von PIOMELLI (13, 14), modifiziert nach SCHIELE und Mitarbeitern (18).

D. ERGEBNISSE

Die Ergebnisse des Versuches sind in den Abbildungen 2 bis 5 dargestellt.

23.5.75											
Gr.	Hk.	FEP	Gr.	Hk.	FEP	Gr.	Hk.	FEP	Gr.	Hk.	FEP
9 I	46	128,8	10 I	46	126,1	11 I	47	168,1	12 I	47	162,8
9 II	49	105,8	10 II	50	150,6	11 II	42	193,3	12 II	46	144,9
9 III	44	89,8	10 III	49	83,1	11 III	43	132,0	12 III	44	157,1
9 IV	47	78,8	10 IV	47	81,4	11 IV	44	176,7	12 IV	45	170,0
MW		101,0	MW		110,0	MW		168,0	MW		159,0
%		100,0	%		109,0	%		166,0	%		157,0

Abbildung 2: Ergebnisse der 1. Blutabnahme am 17. Tag nach Versuchsbeginn

20.6.75											
Gr.	Hk.	FEP	Gr.	Hk.	FEP	Gr.	Hk.	FEP	Gr.	Hk.	FEP
9 I	50	86,0	10 I	51	104,1	11 I	46	236,4	12 I	46	291,4
9 II	50	73,4	10 II	50	73,4	11 II	49	180,6	12 II	47	188,3
9 III	50	86,0	10 III	53	81,1	11 III	43	211,7	12 III	46	250,2
9 IV	49	85,2	10 IV	49	92,9	11 IV	44	192,6	12 IV	47	180,3
MW		83,0	MW		88,0	MW		205,0	MW		228,0
%		100,0	%		106,0	%		248,0	%		275,0

Abbildung 3: Ergebnisse der 2. Blutabnahme am 26. Tag nach Versuchsbeginn

2.7.75											
Gr.	Hk.	FEP	Gr.	Hk.	FEP	Gr.	Hk.	FEP	Gr.	Hk.	FEP
9 I	48	93,3	10 I	48	132,1	11 I	45	230,5	12 I	45	245,7
9 II	47	74,8	10 II	48	119,6	11 II	45	215,2	12 II	45	201,9
9 III	50	82,3	10 III	50	96,0	11 III	43	245,2	12 III	44	206,5
9 IV	40	120,0	10 IV	49	96,2	11 IV	44	198,7	12 IV	46	190,0
MW		93,0	MW		111,0	MW		222,0	MW		211,0
%		100,0	%		120,0	%		240,0	%		228,0

Abbildung 4: Ergebnisse der 3. Blutabnahme am 44. Tag nach Versuchsbeginn

16.7.75											
Gr.	Hk.	FEP	Gr.	Hk.	FEP	Gr.	Hk.	FEP	Gr.	Hk.	FEP
9 I	47	96,5	10 I	48	92,4	11 I	42	263,6	12 I	42	312,2
9 II	48	93,3	10 II	51	83,2	11 II	45	244,0	12 II	46	186,6
9 III	50	83,5	10 III	50	79,0	11 III	43	263,8	12 III	45	222,8
9 IV	45	88,9	10 IV	47	82,1	11 IV	44	239,2	12 IV	45	278,6
MW		91,0	MW		84,0	MW		253,0	MW		250,0
%		100,0	%		93,0	%		279,0	%		276,0

Abbildung 5: Ergebnisse der 4. Blutabnahme am 54. Tag nach Versuchsbeginn

Als Resultat stellt sich folgendes dar:

1. Bei den Tieren der PbCl_2 - sowie der $\text{ZnCl}_2 + \text{PbCl}_2$ -Gruppe kam es zur deutlichen Erhöhung der FEP-Werte im Vergleich zu den Kontrolltieren. Diese Werte korrelierten bis zum 26. Tag mit den verabreichten Bleidosen und erreichten ab 44. Tag ein erhöhtes Plateau. Die Unterschiede zu den Kontrolltieren sind mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,001% signifikant. Die Werte der Kontrolltiere lagen unverändert bei einem FEP-Wert von ca. 100 g FEP/100 ml RBC.
2. Die Werte des FEP der Tiere, die nur Zink erhalten haben waren im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant erhöht.
3. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede der FEP-Werte zwischen der Blei-Gruppe und der Zink- und Blei-Gruppe. Zink beeinflusste also die bleibedingte FEP-Erhöhung nicht.

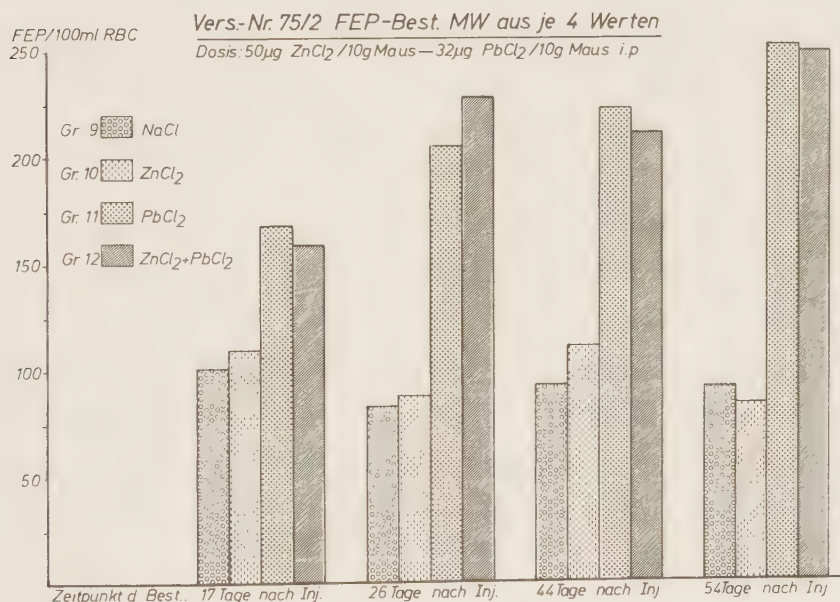


Abbildung 6: Schematische Darstellung unserer Versuchsergebnisse

E. DISKUSSION

ALA-D und die Ferrochelatase (Haemsynthetase) sind zwei Enzyme die an der Hämoglobinsynthese beteiligt sind (Abb. 1). Sie enthalten SH-Gruppen, die durch SH-Reagenzien aktiviert und durch SH-Inhibitoren, zu denen auch Blei zu rechnen ist, gehemmt werden (5). Eine Bleiwirkung auf andere Enzyme wird vermutet. Funktionelle Störungen der Haemopoese treten erst bei einem Blut-Blei-Spiegel von über 60 $\mu\text{g Pb}/100\text{ ml}$ in Erscheinung, obwohl die durch die Enzymhemmung hervorgerufenen biochemischen Veränderungen bei weitaus geringeren Konzentrationen nachweisbar sind (17).

Die funktionellen Folgen der Hemmung der ALA-D und der Ferrochelatase auf die Haemopoese sind unterschiedlich.

1. Trotz der starken Hemmwirkung des Bleis auf die ALA-D-Aktivität kommt es zu keiner erheblichen Störung der Haemsynthese (5), denn auch bei einer starken Depression der ALA-D-Aktivität bis zu 2% der Ausgangswerte ist die Regenerationskurve von Hämoglobin und Erythrozyten nach einer starken Haemorrhagie mit der Regenerationskurve von normalen Tieren identisch (2). Das könnte bedeuten, daß der Organismus für diese Funktion nur eine geringe Quantität dieses wichtigen Enzyms der Hämoglobinsynthese benötigt. In einem weiteren Konzentrationsbereich ist also die bleibedingte Hemmung der ALA-D nicht als toxisches Phänomen anzusehen, welches die Blutbildungsfunktionen des Organismus beeinträchtigt.
2. Die Hemmung der Ferrochelatase durch Blei ist dagegen nicht ohne funktionelle Folgen. Die Störung dieser En-

zymaktivität ist die Hauptursache der bleibedingten Anämien in den späten Stadien der Bleivergiftungen. Auch in den frühen Stadien ist die Bleiwirkung auf dieses Enzym durch die Erhöhung des freien Porphyrins und des freien Eisens in den Erythrozyten erfaßbar.

Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, daß im Gegensatz zu der inhibierenden Wirkung von Zink auf die bleibedingte Hemmung der ALA-D-Aktivität Zink keinen Einfluß auf die Erhöhung von FEP nach Bleiapplikation hat. Diese Beobachtung, daß bei unseren in vivo-Versuchen die von uns verwendeten Zinkkonzentrationen die Ferrochelataseaktivität nicht verändert, läßt sich dadurch erklären, daß die ALA-D ein zinkenthaltendes Metallenzym ist, während die Ferrochelatase nicht zu den Zinkenzymen gerechnet wird (11).

Die Vermutung, Zink könnte wegen seiner aktivierenden Wirkung auf den Protoporphyrinmetabolismus die Erhöhung des FEP durch Blei verstärken, bestätigte sich in unseren Versuchen nicht (4, 7, 10, 19). Die FEP-Werte der Blei- und der Zink- + Blei-Gruppe zeigen keine statistisch signifikanten Unterschiede. Die Möglichkeit ist allerdings nicht auszuschließen, daß bei höheren Zinkkonzentrationen, als den von uns benutzten, ein Effekt dieser Art auftritt.

Auch die Annahme, freies Porphyrin könnte mit Zink Zink-Porphyrin-Komplexe bilden, die im Organismus gespeichert werden (9, 16) und die daraus resultierende Verminderung des FEP würde eine antagonistische Wirkung zwischen Zink und Blei vortäuschen, kann durch die vorliegenden Befunde nicht gestützt werden. In diesem Falle wäre zu erwarten, daß die FEP-Werte der Zink- und Blei-Gruppe niedriger als die der Blei-Gruppe wären, was bei unseren Versuchen nicht zutrifft.

F. ZUSAMMENFASSUNG

In einer Reihe von Tierversuchen verabreichten wir Mäusen intraperitoneal Zink und Blei einzeln und kombiniert und untersuchten die Wirkung dieser Schwermetalle auf die Veränderungen des freien Protoporphyrins in den Erythrozyten im Vergleich zu Kontrolltieren. Die Experimente führten zu folgenden Ergebnissen:

1. Die Erhöhung des FEP-Gehaltes der Erythrozyten die als Folge einer Behandlung mit Blei auftritt, wird auch durch die gleichzeitige Verabreichung von Zink nicht vermindert.
2. Die Verabreichung von Zink allein hat keinen Einfluß auf die FEP. Die im Vergleich zu den Kontrollwerten geringe Erhöhung der FEP-Werte einiger der mit Zink gespritzten Tiere ist nicht signifikant.
3. Zink scheint bei den von uns verwendeten Konzentrationen mir Porphyrin keine Komplexe zu bilden, die der Organismus speichern könnte. Bei der Verabreichung von Zink und Blei gleichzeitig wäre eine Erniedrigung der FEP-Werte zu erwarten gewesen.
4. Eine antagonistische Wirkung von Zink und Blei, wie sie für die Aktivität der ALA-D nachgewiesen wurde, scheint im Falle der Ferrochelatase nicht zu bestehen.

G. LITERATUR

1. ALBAHARY, C.: Lead and Hemathopoiesis. The mechanism and consequences of the erythropathy of occupational lead poisoning.
Am.J.Med., 52 (1972), 376-378.
2. AZAR, A., H.J. TROCHIMOVICZ, M.E. MAXFIELD: Review of lead studies in animals carried out at Haskell Laboratory. Two year feeding study and response to hemoragic study.
International Symposium - Environmental health aspects of lead, Amsterdam, October 2-6, 1972.
3. BALOH, R.W.: Laboratory diagnosis of increased absorption.
Arch.environm.Hlth, 28 (1974), 198-208.
4. CEH, A., J.B. NEILANDS: Zinc, an essential metal ion for beef liver Delta-amino-levulinate dehydratase.
Biochem.Biophys.Res.Comm., 55 (1973), 1060-1063.
5. CHISLUM, J.J.: Disturbance in the biosynthesis of heme in lead intoxication.
J.Pediatr., 64 (1964), 174-185.
6. HAMMOND, P.B.: Metabolism and metabolic action of lead and other heavy metals.
Clin.Toxicol., 6 (1973), 353-365.
7. KOMAI, H., J.B. NEILANDS: Effects of zinc ion on porphyrin biosynthesis in Ustilago sphaerogena.
Fed.Proc., 26 (1967), 2322.

8. LABE, P., C. VOLLAND, P. CHAIX: Étude de l'activité ferrochélatase des mitochondries de levure.
Biochim.Biophys.Acta, 159 (1968), 527-539.
9. MIHAK-DEVIC, D.: Methodology of zinc determinations and the role of zinc in the biochemical processes.
Adv.Clin.Chem., 13 (1970), 271-326.
10. MUTHUKRISCHNAN, S., K. MALATHI, G. PADNAMABAN: Delta-aminolaevulinate dehydratase, the regulatory enzyme of the biosynthesis pathway in *Neurospora crassa*.
Biochem.J., 129 (1972), 31-37.
11. PARISI, A.F., B.L. VALLEE: Zinc Metalloenzymes, characteristics and significance in Biology and Medicine.
Amer.J.clin.Nut., 22 (1969), 1222-1239.
12. PETERING, H.G., M.A. JOHNSON, K.L. STEMMER: Studies of zinc metabolism in the rat. I. Dose-response effects of Cadmium.
Arch.environm.Hlth, 23 (1971), 93-101.
13. PIOMELLI, S.: A micromethod for free erythrocyte porphyrins: The FEP test.
J.Lab.clin.Med., 81 (1973), 932-940.
14. PIOMELLI, S., B. DAVIDOW, V.F. GUINEE, P. YOUNG, G. GAY: The FEP (free erythrocyte porphyrins) test: a screening micromethod for lead poisoning.
Pediatrics, 51 (1973), 254-255.

15. PRASAD, A.S., D. OBERLEAS, P. WOLF, J.P. HOROWITZ:
Studies on zinc deficiencies changes in trace elements and enzymes activities in tissues of zinc deficient rats.
J.Clin.Invest., 46 (1967), 549.
16. ROMAN, W.: Zinc in Porphyria.
Am.J.clin.Nut., 22 (1969), 1290-1303.
17. SASSA, S., J.L. GRANICK, S. GRANICK, A. KAPPAS, R.D. LEVERE: Studies in lead poisoning. I. Microanalysis of erythrocyte protoporphyrin levels by spectrofluometry in the detection of chronic lead intoxication in the subclinical range.
Biochem.Med., 8 (1973), 135-148.
18. SCHIELE, R., K.H. SCHALLER, H.M. WAGNER: Die Bestimmung der freien Erythrozytenporphyrine als schneller Suchtest einer erhöhten Bleiexposition und seine Validität im Vergleich zum Blutbleispiegel und zur Delta-Aminolaevulin-säure-Dehydratase-Aktivität.- Stuttgart: Gustav Fischer 1974.
= Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene, H. 41.
19. SCHLIPKÖTER, H.-W., L. GHELERTER, B. OST: Untersuchungen zur Kombinationswirkung von Zink und Blei.
Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt., Orig., B, 160 (1975), 130-138.

Herrn Prof.Dr.med. H.-W. Schlipköter danke ich für die Überlassung des Themas und die großzügige Unterstützung meiner Arbeit.

Frau Dr.med. L. Ghelerter danke ich für die tatkräftige Hilfe bei den experimentellen Arbeiten.

Ebenso gilt mein Dank den medizinischen Assistentinnen Frau Ch. Zenk und Frau U. Gotzsch.

LEBENS LAUF

Am 9. April 1954 wurde ich als zweites Kind des Dr.med. Rudolf Mende, Facharzt für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde und seiner Ehefrau Ingeburg, geb. Metzger, in Landau/Pfalz geboren.

Mit knapp sechs Jahren wurde ich Ostern 1960 eingeschult. In den vier Grundschuljahren besuchte ich den Schulhof Landau/Pfalz, anschließend neun Jahre lang das Staatliche Eduard-Spranger-Gymnasium in Landau, wo ich am 15. Mai 1972 meine Reifeprüfung ablegte.

Ab Wintersemester 1972/73 studierte ich Medizin an der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz und nach dem Physikum seit dem Wintersemester 1974/75 an der Universität Düsseldorf.

Ich befinde mich im vierten klinischen Semester und beabsichtige im Sommer 1978 mein medizinisches Staatsexamen abzulegen.

